

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平11-507536

(43) 公表日 平成11年(1999) 7月6日

(51) Int.Cl.⁸

識別記号

F I

C 1 2 Q 1/32

C 1 2 Q 1/32

G 0 1 N 21/78

G 0 1 N 21/78

27/327

27/42

C

27/42

3 1 1

27/30

3 1 1

3 5 3 S

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 21 頁)

(21) 出願番号 特願平9-502059
 (86) (22) 出願日 平成8年(1996) 6月6日
 (85) 翻訳文提出日 平成9年(1997) 12月8日
 (86) 国際出願番号 PCT/US96/09869
 (87) 国際公開番号 WO96/39534
 (87) 国際公開日 平成8年(1996) 12月12日
 (31) 優先権主張番号 08/467, 712
 (32) 優先日 1995年6月6日
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 イゲン, インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国 20877 メリーランド州,
 ガイザーズバーグ, インダストリアル ド
 ライブ 16020
 (72) 発明者 マーチン, マーク ティー.
 アメリカ合衆国 20852 メリーランド州
 エヌ. ベセスダ, オールド ファーム
 コート 516
 (74) 代理人 弁理士 浅村 皓 (外3名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 電気化学発光性酵素バイオセンサー

(57) 【要約】

電気化学発光性酵素と、その製造と、バイオセンサーとして使用が開示されている。特定的には2つの付属枝が望ましい脱水素酵素に共有的に結合している：即ち
 (1) ニコチンアミド・アデニン補因子又はその類似物と(2) 発光性ルテニウム錯体である。例えば、グルコース濃度は次の方法である。2重修飾グルコース脱水素酵素はグルコースを酸化すると同時に結合NAD⁺をNADHに還元する。NAD⁺でなく、NADHが表面のルテニウムと相互作用してECLを促進するので、グルコースと反応した酵素分子のみがECL計器中でそのルテニウム標識から光を発生させる。酵素表面上のNADHとルテニウムの比較的近いことにより遊離溶液中での同一濃度と比較して発光が向上する。NADHがルテニウムを還元すると、これはNAD⁺に戻り、1箇の酵素分子からECL発光を多重サイクルで行える。このようなバイオセンサーは溶液で又は固定表面に固定して使用できる。バイオセンサー分子を使用する定量法はIGE N o r i g e nTM 分計計で実施できる。

【特許請求の範囲】

1. 脱水素酵素の活性部位の極めて近くに別々に結合した補因子とTAG部とを含み、これら相互と活性部位内に含有され基質との電気化学的相互作用ができるようにして成る、化学発光信号を発生できる酸化還元酵素複合体。
2. 上記酸化還元酵素がグルコース脱水素酵素、アルコール脱水素酵素、乳酸塩脱水素酵素から成る群から選ばれた脱水素酵素である、請求項1に記載の酸化還元複合体。
3. 上記脱水素酵素がグルコース脱水素酵素である、請求項2に記載の脱水素酵素複合体。
4. 補因子がNADHであり、上記TAGがRu(bpy)₃²⁺である、請求項3に記載の脱水素酵素抱合体。
5. 上記TAGが活性部位近くに配置されたリシンに共有結合している、請求項3に記載の脱水素酵素複合体。
6. 上記補因子が活性部位近くに配置したシステインに共有結合している、請求項3に記載の脱水素酵素複合体。
7. 請求項1に記載の酸化還元酵素複合体を含むバイオセンサー。
8. 上記酸化還元酵素が電極に機能的に固定されている、請求項7に記載のバイオセンサー。
9. 上記酸化還元酵素が固定されている、請求項7に記載のバイオセンサー。
10. 更に上記酸化還元酵素複合体の極く近くに配置した電極を含み、TAGの最適誘導により発光信号を発生させる、請求項7に記載のバイオセンサー。
11. 上記酸化還元酵素抱合体が電極に固定化されている、請求項10に記載のバイオセンサー。
12. 試料中の酵素基質濃度決定法において、
 - (a) 上記酵素基質含有試料と請求項1に記載の酸化還元酵素複合体とを、酵素基質の酸化ができる条件下で接触させる工程と、
 - (b) 基準値からの化学発光の変化を測定する工程と、
 - (c) 化学発光信号の測定値の変化に基づき酵素基質濃度を決定する工程とか

ら成る、決定法。

13. 上記測定と決定がリアル・タイムに基づいて行われる、請求項 12 に記載の方法。

14. 酵素基質の決定か反応の確立された動力学的パラメーターの比較から行われる、請求項 12 に記載の方法。

15. 酵素基質濃度の決定か計器中での速度測定に基づき行われる、請求項 12 に記載の方法。

16. 工程が同時に行われる、請求項 12 に記載の方法。

17. 化学発光に必要な電圧をパルス化して補因子と T A G を活性的に再循環する、請求項 16 に記載の方法。

18. (a) 分析物質を含有すると思はれる試料を請求項 7 に記載のバイオセンサーと接触させ、

(b) 工程 (a) の接触処理試料を電気化学発光を生ずる条件に付し、

(c) 発生する電気化学発光を測定して読み取り、

(d) 化学発光信号の読みの測定値変化に基づいて酵素基質濃度を決定することから成る、分析物質の存在の測定法。

19. 請求項 1 に記載の酸化還元酵素複合体と適切な緩衝系を含む、電気化学発光定量法を実施するのに適切なキット。

20. 上記脱水素酵素複合体が固体表面に固定化されている、請求項 19 のキット。

21. 上記複合体が固体表面に固定化されている、請求項 1 に記載の酸化還元複合体。

22. 酸化還元酵素基質をその酸化形に転換する方法において、

(a) 上記基質と請求項 1 に記載の酸化還元酵素とを基質の酵素酸化を促進する条件下で接触させ、

(b) 酸化基質を回収することから成る、方法。

【発明の詳細な説明】

電気化学発光性酵素バイオセンサー発明の背景1. 発明の分野

本技術分野は分析生化学であり、特に診断学に関する。更に詳しくは、本発明は新規酵素に基づくバイオセンサーの製造と使用を含み、本バイオセンサーは目的に合せた脱水素酵素の有用な性質と電気化学発光（ECL）に基づく定量法フォーマットとを混合させて、在来のバイセンサー配列で特定の1種又は複数の分析物質の検知と数量化を行うものである。

2. 背景情報

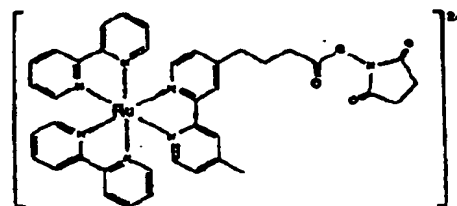
バイオセンサーは生体分子、例えば酵素又は抗体、または全細胞テスターを含む。バイオセンサは環境および／又は臨床試料中の物質を迅速、且つリアルタイムに検知するのに用いられる。本発明のバイオセンサーは酵素-補酵素-電気化学発光標識複合体の生成を含む。これらの開発は学際的な努力の成果を反映したものである。関連技術領域の背景を以下に記述する。

電気化学発光（ECL）に基づく定量法は技術的に公知であり、その正確さ、使用上の容易さ、放射性物質を使用しないことでその用途は拡大の方向にある。

特に有用なECL系はヤン（Yang）、等の論文（Bio/Technology, 12, 193～194頁（1994年2月））に記載されている。また、マッセイ（Massey）の論文（Biomedical Products（1992年10月））、同じく米国特許第5, 235, 805号、第5, 310, 637号参照のこと。これらの論文、および特許の内容はこれを言及することで本明細書に組み込まれる。

ECL法は多くの異なる分子について幾つかの異なる機構が提示されてきた。ブラックバーン（Blackburn）、等（1991）：clin. chem. 37/9, 1534～1539頁では、これらの筆者達はルテニウム（II）トリス（ビピリジル）、 $Ru(bpy)_3^{2+}$ とトリプロピルアミン（TPA）のECL反応（リーランド（Leland）、等（1990）：J. Electrochem. Soc. 137: 3127～3129））

を用いてこの技術を提示している。 $Ru(bpy)_3^{2+}$ の塩は極めて安定な水溶性化合物であり、ビピリジル配位子の1つが反応基で化学的に修飾されて活性種を形成し、これで蛋白質、ハプテン、核酸は容易に標識される。ブラックバーン、等が用いた $Ru(bpy)_3^{2+}$ の活性型は $Ru(bpy)_3^{2+}-NHS$ エステルである。



目的に合せた酵素複合体の生成は特に臨床生化学領域では発展領域である。イーベリング (Ebeling)、等 (米国特許第5, 250, 415号) は組換え技術を用いてNAD/NADPと依存性グルコース脱水素酵素の品質と安定性を向上させている (E. C. 1. 1. 1. 42)、組換え技術の使用により、イソ酵素が高品質で産生され、これらの酵素は20°～50℃の温度範囲で同等の安定性を示している。これらの酵素は医学的診断用に適切であると開示されている。結合再生性部を有する酵素複合体生成を含む半合成グルコース酸化酵素の生成が或る研究グループにより試みられ、ある程度の成功が収められたヨモ (Yomo)、等：5-エチルフェナジン-グリコース-脱水素酵素-NAD複合体の製造と動力学的性質 (European J. Biochem. (ドイツ) (1991年9月15日)、200 (3) 巻、759～66頁。5-エチルフェナジン-グリコース-脱水素酵素-NAD複合体 (EP (+)-GlcDH-NAD+) はポリ (エチレングリコール)-結合5-エチルフェナジンとポリ (エチレングリコール)-結合 Na^+ の両方をグルコース脱水素酵素に結合させて製造される。この複合体は酸素又は臭化3-(4, 5-ジメチル-2-チアゾイル)-2, 5-ジフェニル-2, 4, 6-トリメチル-5-テトラゾリウム (MTT) を電子受容体として用いるグルコース酸化酵素活性を有する半合成酵素である。この半合成酸化酵素は触媒工程が2つある：即ち、グルコース脱水素酵素部の活性部位により NAD^+ 部の還元と、エチルフェナジン部の別の触媒部位によるNADH部の酸化である。

蛋白質中のアミノ基の選択的標識、例えばベーターD-グルコース:NAD (P+) 1-酸化還元酵素 (EC 1. 1. 1. 47) が提示されている。ボズラ (Bozler)、等 (Biochim. Biophys. Acta, 749巻、3号、238~43頁) はグルコース脱水素酵素をリシン基の所で (2-5'-ジメチルアミノナフタレン-1-スルホンアミド) メチルアミド酸メチルエステルで選択的に標識した。このエステルは蛋白質のアミノ基の蛍光標識を目的として合成された。ダンシル基の組み込みは外的蛍光プローブとしての役目を果たし、分光光度計で測定できる。

バイオセンサーは絶えず成長する技術領域である。用語「バイオセンサー」は広範囲の技術を包含し、学際的努力の成果を反映するものである。この領域では感度、信頼性、迅速性の向上が絶えず要求されている。

バイオセンサー技術の共通の糸は分析物質の測定での生物学的材料の使用にある。これはむしろ包括的な定義である。

諸技術の混合を示すこの分野での代表的な教科書は1992年に米国化学会 (ワシントンDC) 刊行のポール・R・マッシュウソン (Paul R. Mathewson) とジョン・W・フィンリー (John W. Finley) 編集の「バイオセンサー設計と応用」である。

必要な生物学的分子の外にバイオセンサーは各種の測定系、例えば測定電極と発光カウンターから成る電極系 (ここでは反応層が電極系と接触している) を含むものである。この反応系は典型的には1つの分子電子受容体、1種の測定酵素と化学発光センサーとから成る。バイオセンサー系の多様性は米国特許第5, 324, 835号、第5, 229, 202号、第5, 384, 028号に示されているような装置から判る。

NAD消費のない安定な測定値が得られるグルコース・バイオセンサーは公知である。このようなバイオセンサーは補酵素の電気化学的再生により液状混合物中の1種又はそれ以上の成分の定性又は定量分析に有用である。典型的には、かかる電極は、電極表面に吸着されたレドックス・ポリマーと、1種又はそれ以上酵素 (少なくとも1つは脱水素酵素である) と、補酵素 (例えばNADH、NADPH又はこれらの類縁体) から成る。ゴードン (Gordon)、等の米国特許第5,

264, 092号参照のこと。

別のアプローチが米国特許第5, 340, 722号（ウルフベイス（Wolfbeis）、等）に提示されており、フラビン補酵素（FMN、FAD）、酸化酵素およびオキシゲナーゼを含むバイオセンサーを用いる連続的可逆測定法が教示されている。この定量法は蛍光に基づくものである。酵素酸化中にこの補酵素は同時に還元形に転移し、これは次いで直ちに酸素により酸化形に再転換される。この酸化形から還元形への転移は蛍光性の変化と連結しており、この変化は分析上のパラメーターとしての役を果たす。

しかし、バイオセンサーの経済性、信頼性、感度、応答性を更に向上させる必要の余地が未だ残っている。

発明の概要

広義には、本発明はTAGと望ましいヌクレオチド補因子（補酵素）を活性部位近くに適切に配置修飾した脱水素酵素を有するバイオセンサーを用いた電気化学発光に基づく定量法を目的とする。このような配置により反応回数が向上し、系のエネルギー効率が改善し、これにより酵素又はこれらの基質および補因子検知の正確さ、速度、信頼性、等が改善される。

本発明の目的はECLに基づく定量法の感度と特異性の両方を向上させること、および試薬を大切に使うことにある。

監視又は検知する分析物質は脱水素酵素の基質又は脱水素酵素の基質へ転換できる物質のいずれかである。脱水素酵素はECL計器により分析物質感知が行える分子である。本発明のバイオセンサー分子は、バイオセンサー分子で測定される生成物を産生する別の酵素又は酵素系と協同して用いることも含むものである。これにより更に用途範囲は拡大される。

脱水素酵素はその天然形では存在せず、むしろ化学的に修飾して2種の付属枝を持たせている。1つの付属枝は共有的に結合させたNAD(P)⁺の機能性類似体であるNAD(P)Hであり、このような酵素は製造されてきた〔パーソン（Persson）、等1991〕、このニコチンアミド補因子は、酵素の活性部位に結合して天然酵素機構の一部としてレドックス試薬としての作用が行えるように特異的に結合する。第2の付属枝はECL標識（例えばRu(bpy)₃²⁺誘導体

)

である、かかる蛋白質は製造されてきた（ブラックバーン、等、1991）。

本バイオセンサーの作用の仕方は次の通り。

（1）分析物質は2重修飾酵素の NAD^+ 形により酸化されて、酵素を NADH 形に転換させる。

（2）ECL計器で電圧をこの酵素に印加して電子を発光性ルテニウム含有付属枝に供与して NADH 付属枝を酸化させ、一方発光性ルテニウム含有付属枝は発光する〔ドーネイ (Downey)、等、1992〕。その結果、 NADH は NAD^+ に戻り、分析物質の第2分子が酸化され、このサイクルが繰返えされる。ルテニウム標識蛋白通過の電子移動の提示は既に行はれている。（パン (Pan)、等、1993；ウッケ (Wuttke)、等）。

上記の機構で機能する分析物質（およびそれらの酵素）のうちの幾つかはグルコース（グルコース脱水素酵素）、エタノール（アルコール脱水素酵素）および乳酸塩（乳酸塩脱水素酵素）である。しかし、その他の酸化還元酵素（例えばM・ディクソン (Dixon) とE. C. ウェブ (Webb)：酵素（アカデミック・プレス（1997））の684～702頁に列挙されたもの）も利用できる。これらの選択は適当な結合性基（例えば、エステル、チオールエステル、等）により NAD またはTAG部のいずれかに結合できる側鎖を有する活性部位近くのアミノ酸の位置で左右される。

本発明の主な長所は、

（1）潜在的感度が高く、バックグラウンドが低い。試薬の（単一分子上での）固定性がエントロピー効果から望ましい。相対的にこれらの効果的濃度が極めて高いので、溶液中で遊離状態にあるときよりも実質的に（光の）効率が高い。

（2）酵素、 NADH 、ルテニウム化合物が溶液中で遊離状態にある同一の系よりも恐らく分析費用は安い。このため、試薬の濃度は低くても遊離状試薬で得られる結果と同等の結果が得られ、また、1箇の NADH 分子が再循環できるので、分析費用は低減される。

（3）3種の試薬を1分子に結合させることは固定化系では魅力がます。バイ

オセンサーを固定化できることは再使用できるので極めて魅力的である。酵素しか固定化できないときは、他の試薬 (NADH と $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$) は分析毎

に添加する必要がある。本発明では、すべての試薬は機能的に固定化できる。

バイオセンサー分子を使用する装置は典型的には分子を固定化状態で使用する。固定化で分子に安定性が与えられ、所望の領域で連続的に存在させて最適な実施が行える。本発明のバイオセンサー分子に用いる技術の典型例が「酵素学の方法」136巻(1987)の3～34頁に開示されている。

現在、本発明のグルコース脱水素酵素の好ましい使用例はグルコース・バイオセンサーとしてである。固定化 NADH 分子を有する機能的グルコース脱水素酵素は製造されてきた (パーソン (Parsson)、等、1991)、この修飾酵素と $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ -NHS エステル (IGEN 社、メリーランド州、ロックビル) とを在来法 (この化合物を抗体上に存在する表面リシンに結合させるのに用いてきた) で反応させることができる (ブラックバーン (Blackburn)、等、1991)。このような修飾で1種又はそれ以上のルテニウム付属枝ができる (若し酵素が活性である限り、多数の付属枝は許容され又は有利でさえある)。2重修飾酵素は透析又はクロマトグラフィで精製できる。グルコール添加後、ECL 計器 (在来の NADH 分析) での試験では、酵素の活性に応じた光信号の発信があり、一方酵素活性はグルコース濃度で変わる。

先行技術と比較した本発明の改良点は上記した通りであり、これは感度、費用、固定化の容易さを含む。感度の向上 (ルテニウムとニコチンアミド補因子とが脱水素酵素に結合していない、同等の定量法よりも) は電子移動が分子内の性質に関係する利点から生ずることにある (パム・リアン (Pam Liang) とマーク・マーチン (Mark Martin) 未刊行 ECL 結果)。費用の節減は2重修飾酵素の再使用可能性に基づく (遊離酵素、ルテニウム錯体、ニコチンアミド補因子の回収と再使用に較べて回収は容易である)。最後に、3種のすべての成分を固体表面に機能的に別々に固定化することは実用的でない。この3種すべてを1つの機能性分子にカップリングさせると固相固定化ができる。(従って、酵素、ルテニウム、補因子が溶液中で遊離であるものと比べて好都合となり、費用が低減する)。

NAD標識グルコース脱水素酵素の製造法は公知である。脱水素酵素はかなりの保守性の高いグループの酵素であり、従って、その他の脱水素酵素での類似の方法が使用できる。 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ -NHSエステルで（リシン経由で）蛋

白質（通常抗体）を標識する方法も公知である（Igen社の技術ノート）。

本発明の酵素バイオセンサーは、使用する際にはECL計器と分析物質（例えばグルコース）含有溶液が必要である。分析物質（例えばグルコース）含有溶液は必要あれば適当に希釈して酵素バイオセンサーと溶液中で混合する。分析物質の測定法は少くとも2つある。即ち、分画酵素代謝回転に基づくものと、ECL計器での速度測定によるものとである。分画酵素代謝回転法ではECLを一定の時間経過後、即ち、すべての酵素分子が完全に1回転するのに要する時間前に測定する。分析物質濃度と時間を適切に調節すると、100%未満の酵素分子がグルコースと反応して最大値未満のECLが発生する。反応上確立されている速度上のパラメーターからグルコース濃度を決定できる。分析物質濃度はまた計器中での速度測定でも決定できる。ECL反応の進行と同時に（例えば電圧をパルス化して）NADHが活性的に再循環して、速度測定ができるように酵素反応を行うことができる。

この同一系を試薬の共有結合を行わずに使用できる。または、非ECL系もルテニウムなしで使用でき（遊離酵素と遊離） NAD(P)^+ 、生成 NAD(P)H のUV吸収が分光光度測定で監視できる。

酵素活性で又ECL活性の新規 NAD(P)H 類似化合物が使用できる。また、非ルテニウムECL活性発光体が $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ の代りに使用できる。

発明の詳細な説明

ECL励起機構は次の通り。分析物質を本発明のバイオセンサー分子の存在下で酸化させて、 NAD^+ 含有付属枝をNADHに転換する。 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ （TAG）とNADHは金電極表面上で酸化され、それぞれ $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ と NADH^+ となる。（本説明では NAD^+ とTAGは脱水素酵素に共有的に結合している）。この NADH^+ は水素を自発的に失って、 NAD^- となる。この NAD^- は強力な還元剤であり、強力な酸化剤である $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ と

反応して検知剤 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ ※を励起状態にする。この励起状態は通常の蛍光機構を経由して基底状態まで崩壊し、620 nmの波長の光子を放出する。

適切な電気化学的検知剤である有機化合物は、例えばルーベンと9,10-ジフェニルアントラセンを含む。多くの有機金属化合物は適切な電気化学的検知剤

であるが、好ましくはRu含有化合物（例えばルテニウムIIトリスビピリジンキレート）、Os含有化合物が用いられる。本開示の発明に有用な検知剤は米国特許第5,310,687号に記載されており、この内容はこれを言及することで本明細書に組込まれる。

これらの検知剤は長期安定性である。更に、これらの検知剤は安定性があり、比較的安価であり、極めて特性的な信号を発信し、天然には存在しないものである。このような検知剤の発光に基づく測定は鋭敏で迅速、再現性があり、計装が簡単である。信号は検知剤の分子毎に繰返し発信され、これらの検知剤の検知感を向上させる。本発明の好ましい電気化学的発光性検知剤は $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ が好ましい。この検知剤又はその同等剤の使用量は一定していない。

これらの検知剤は生物学的又は食物試料中に直接、即ち試料の前処理を行わずに使用できる。

励起状態の発生に必要なエネルギーは $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ と NAD^+ の電気化学的ポテンシャルの差が大きいことによる。励起状態の $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ ※は通常の蛍光機構を経由して崩壊し、620 nmの光子を放出する。この過程で $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ の元の形に再生され、何回もこの反応系列を循環する。従って、各ECL活性検知剤は各測定サイクル中に光子を放出するので、検知性が向上する。

$\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 検知剤の数量比は比較的簡単な装置で容易に自動化できる。計器の心臓部はECL反応開始用の作用電極と対向電極を含む電気化学的フローセルである。両電極は金製であるが、他の材料も効果には違いがあるが使用されてきた。ポテンシオスタットが各種電圧の波形を電極に印加し、単一の光電子増倍管(PMT)でECL反応期間中に放出される光を検知する。Ag/AgC

1 参照電極をフローセル下流の流体流路中に設け、蠕動ポンプを用いて、各種流体をフローセルを貫通させて抜き出す。典型的な系列では、測定流体を試験管から抜き出してフローセルに導入し、ランプ (ramp) 電圧を電極印加し、発光を測定して検知剤を数量化する。測定後、高 pH 洗滌液を拔出してセル中に導入して電気化学的洗滌法を行う。状態調節剤を次いで抜き出してセル中に導入し、電極表

面を高度に再生させる状態にする電圧波形を印加して、次の測定サイクルの用意をする。

ECL 反応は多くの異なる電圧波形で効果的に開始できる。作用電極電流と ECL 強度の測定は電極に三角波を印加して行う。表示の印加電極は実際に Ag / AgCl 参照電極で測定した電圧であり、顕著な未補償抵抗効果を含む、従って、作用電極に印加した実際の電圧は実質的には表示のものよりも低い。三角波形は $750 \text{ mV} / \text{秒}$ の速度で 565 から $2,800 \text{ mV}$ へと上昇し、次いで同一速度で $1,000 \text{ mV}$ まで減少する。セル中を流れる電流は第 1 に分析物質の酸化と水の加水分解の結果である。分析物質と $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ の両方の酸化は印加電圧が $-1,100 \text{ mV}$ に達するときに生じ、発光する。発光強度は、電極表面の分析物質が枯渇されるまでは印加電圧に応じて増加するが、このあとは強度は減少する。測定発光強度は充分大きいので、光子計数モード又は電流モードのいずれかで操作される在来の PMT で容易に測定できる。

試料をバイオセンサーと接触させたあと、ECL 測定を作用電極に電位を印加して行う。これにより発光から特定の信号が得られる。比較的僅かの干渉は、試料又は添加緩衝液中に存在する他の物質によるバックグラウンドから生ずる。

従って、本発明の方法実施に適した装置と方法は前述の米国特許第 5,068,088 号、第 5,061,455 号、第 5,093,268 号、第 5,147,806 号、第 5,221,605 号に開示のものを含み、これらの特許はこれを言及することで本明細書に明示的に組込まれる。更に、測定系で検知剤として使用する電気化学的発光性分子は米国特許第 5,310,687 号、第 5,310,687 号に記載のルテニウムとオスミウムの 2 齒状芳香族複素環窒素含有

配位子を含み、これらの特許これを言及することで本明細書に明示的に組込まれる。

本定量法実施に必要な材料を含有した試薬キットは取扱を容易にし、標準化を促進するために組立てられる。このキットに含まれる材料は最終目的で変更できる。典型的には、補因子とTAGで活性部に又はその近くを標識した修飾酵素ムテイン抱合体と、必要な緩衝液と標準とを含む。また、キットは、用途により測定又は検知酵素系を含む。標準は化学試薬又は本定量法実施に必要な校正に要する印刷又は電子型の（実験）データである。

実施例 1

NAD⁺-アルコール脱水素酵素-Ru(bpy)₃²⁺複合体の製造

脱水素酵素がNAD⁺類似体とRu(bpy)₃²⁺の誘導体の両方に共有的に結合したバイオ複合体は製造可能である。この場合、酵素は突然変異体蛋白質ではなくて、むしろ天然に存在する酵素分子である。天然に存在する酵素を用いる利点は抱合体製造での突然変異誘発を不要とすることであるが、ある場合には、NAD⁺類似体又はRu(bpy)₃²⁺誘導体と反応する天然アミノ酸側鎖の配置が満足しないため突然変異体酵素の製造が好ましく又は必須となることがある。NAD⁺又はRu(bpy)₃²⁺誘導体と反応する天然アミノ酸は存在させなくともよく、または（酵素活性部位に比べてNAD⁺類似体の適切な配置を必要とする）酵素反応、または（NAD⁺類似体に較べてRu(bpy)₃²⁺誘導体の適切な配置を必要とする）ECL反応のいずれに対して適切に配置しなくてもよい。

第1部：NAD-ADH複合体の製造〔M. O. モッソン (Mosson)、等：Eur. J. Biochem. 86、455～463（1978）に基づく〕

ADH（馬肝臓アルコール脱水素酵素、シグママ・ケミカル社、ミズリー州セント・ルイス）を50mMトリエチルアミン、pH7.5中で透析する。トリエチルアミン緩衝液1.3ml中の透析酵素5mg（4℃）（酵素濃度約0.1mM）にNAD⁺類似体（N⁶-（〔6-アミノヘキシル〕-カルバモイルメチル）-ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド、リチウム塩、シグマ・ケミカル社）を最終濃度5mMまで添加する。ピラゾール（シグマ・ケミカル）をこの溶液に

濃度10mMまで添加する。(ピラゾールはこれと反応する酵素-NAD⁺錯体を安定化する〔C. ウンクハウス (Woekhou) 、等、Bioorg. chem. 12、45～57 (1983)〕。カップリング剤である1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド (EDC) とN-ヒドロキシスクシンイミド (NHS) を次いで500倍と250倍モル過剰で(酵素が二重体である酵素サブユニット濃度に較べて) 添加する。EDCは12時間間隔で4等分して添加し、NHSは0時と12時間目で2等分して添加する。この混合物を48時間反応させ、反応中はpHをNaOHを添加して7.5に保つ。48時間の反応後、

この溶液を50mMグリシン、50mM重炭酸ナトリウム3l、pH7.5に対して1晩透析する。次いで、この溶液を50mM重炭酸塩3l、pH8.0に対して3回(各回は少くとも6時間) 透析する。

第2部：NAD-ADH-Ru(bpy)₃²⁺抱合体の製造〔B. [L. プラップ (Plapp)、等：J. Biol. Chem. 248、3470～3475 (1973) に基づく〕

上記で製造したNAD-ADH複合体溶液(50mM NaHCO₃中、pH8.0)にピラゾールを最終濃度10mMまで添加し、(通常の)NAD⁺を最終濃度2mMまで添加する。活性部位外のアミノ基は2.1Mアセトイミド酸エチル-HCl (シグマ・ケミカル社) を添加してアセトイミジル化する(酵素溶液が5%だけ体積増加するよう添加する)。(2.1Mアセトイミド酸エチルの貯蔵溶液を新しく作成し、pHを8.0に調整する)。この反応は25℃で1時間行い、更にアセトイミド酸エチルを3回1時間毎に添加する(全反応時間=4時間)。この蛋白質を次いで33mMリン酸ナトリウム、0.5mM EDTA、2.0mMアデノシン・モノホスフェート、pH8.6に対して、次いで0.2M重炭酸ナトリウム、pH8.0に対して広範囲に透析する。外部リシン保護NAD-ADHとRu(bpy)₃²⁺のNHSエステル誘導体(IGEN社、メリーランド州ガイサースバーグ)とを確立された手段で反応させる。未反応(遊離)Ru(bpy)₃²⁺を中性緩衝液液に対して透析して除去する。文献報告と比較すると、酵素サブユニット当り唯1つのRu(bpy)₃²⁺がLys228

上に
取込まれている〔ブレンデン (Bränden)、等: *Experientia Supplemental* 36,

J. ジェフリイ (Jeffrey) 編: 脱水素酵素、62～3頁〕。

実施例 2

$\text{NAD}^+ - \text{ADH} - \text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 触媒活性の定量

定量法 1 と 2 は M. -O. モンソン (Monsson)、等: *Eur. J. Biochem.* 86、455～463 (1978) に基づく、定量法 3 は $\text{NAD}^+ - \text{ADH}$ と $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 複合体によるエタノールの酵素的転換が発光を伴う電気化学発光定量法である。

定量法 1: 分光光度測定、非再生定量法

この定量法は固定化 NAD^+ 類似体を NADH 類似体に還元する。逆方向の反応は生じない (この定量法は非再生法である)。340 nm での吸光度の増加は固定化酵素 NAD^+ 類似体の濃縮を示す ($\Delta E_{340} = 6220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)。

セル中で、酵素を 12 mM セミカルバジッド (シクグマ・ケミカル社) 含有 0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.2) に添加する ($\leq 1 \text{ mM}$)。この溶液を $25.0 \pm 0.1^\circ \text{C}$ で平衡化する。濃厚エタノール (最終濃度 = $500 \mu \text{M}$) を小容積添加する。340 nm での全吸光度変化を測定する。

定量法 2: 分光光度測定再生定量法

この定量法は酵素複合体 ($\text{NAD}^+ - \text{ADH} - \text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$) 表面上の固定化 $\text{NAD}^+ / \text{NADH}$ を連続的に再循環させる。ADH 自体がエタノールがアセトアルデヒドに酸化させるとき NAD^+ を NADH に還元する。第 2 の酵素であるジアホラーゼ (シグマ・ケミカル社) を添加して $\text{NADH} - \text{ADH} - \text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ を $\text{NAD}^+ - \text{ADH} - \text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ に転換して戻す。

機能性 $\text{NAD}^+ - \text{ADH} - \text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ の定量では、下記の溶液をセル中で混合する: 0.5 M トリス (pH 8.5) 200 ml、0.1% ゼラチン (水中、濾過処理) 100 μl 、30 mM INT-バイオレット (10 mM リン酸塩緩衝液中、pH 7.5、10% DMSO、0.01% 濾過処理ゼラチン) 10 μl 、ジアホラーゼ (10 mM リン酸塩中 10 m/ml、pH 7.5) 10 m

1、ADH（又はNAD-ADH又はNAD-ADH-TAG）30ml、100μMエタノール650μl、この混合物の吸光度を490nmで分光光度計を用いて連続的に読みとる。

定量法3：電気化学発光定量法

この定量法は定量法1（上記）と同様にして行うが、エタノールの添加での吸光度増加を測定する代りに類似の酵素複合体溶液（エタノール添加又は無添加で）をIGE ECL分析計（IGEN社、メリーランド州、ガイサースバーグ）を用いて測定する。エタノールが存在しないときは、酵素複合体は $\text{NAD}^+ - \text{ADH} - \text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ （非電気化学発光性）の形である。エタノールのアセトアルデヒドへの酵素的転換のあとでは、酵素複合体は $\text{NADH} - \text{ADH} - \text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ （電気化学的発光性）の形となる。更に、電圧をECL計器中の

酵素複合体に印加して発光させると、抱合体は元の形（ $\text{NAD}^+ - \text{ADH} - \text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ ）に戻る。この元の形は次いでエタノールの別の分子の酸化触媒作用を行い、酵素複合体をもう一度電気化学発光性 NADH 形に転換する。従って、エタノールの存在下多数の光子が酵素複合体により発生する。

実施例3

NAD⁺-突然変異グルコース脱水素酵素-Ru(bpy)₃の製造

この実施例では、グルコース脱水素酵素突然変異体の製造は、 NAD^+ 類似体と反応して NAD^+ -酵素複合体を作るように戦略的に配置された表面スルフヒドリル基が含有されるようにして行う。この突然変異の位置は、束縛 NAD^+ 分子が酵素中の NAD^+ 結合部位に結合して酵素的に効率よく NADH に還元されるような位置とする。次いで、この突然変異グルコース脱水素酵素-NAD⁺複合体を $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ のN-ヒドロキシスクシンイミド（NSH）誘導体と反応させて2重修飾酵素である $\text{NAD}^+ - \text{GlcDH} - \text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ を作る。この酵素複合体はECL計器中で発光性である。この酵素が触媒作用するグルコース分子はすべて表面 NAD^+ を NADH に転換する。ECL計器（IGEN社、メリーランド州、ガイサースバーグ）中では、 NAD^+ でなく、 NADH が酵素表面固定化 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ に作用して光の光子を放出させる。従

って、グルコース1分子は2重修飾酵素により光の光子を1つ放出することになる。更に、ECL法では、 NADH は NAD^+ に再転換するので、この2重修飾酵素は発光して再生され、繰返し使用できる。

第1部：突然変異GlcDHの製造

突然変異GlcDHはこれまで特定部の突然変異誘発により作られてきた〔M. パーソン (Persson)、等：Bio/Technology (1991)、9、280～284〕。グルコース脱水素酵素中の残基asp⁴⁴は標準的突然変異誘発計画によりcys⁴⁴に突然変異した。この突然変異蛋白 (GlcDHcys⁴⁴) はE. Coli中で表現され、在来の手段で精製された。

第2部：システイン反応性 NAD^+ 誘導体の製造

チオール反応性 NAD^+ 類似体が製造されきた〔M. パーソン (Person)、等：Bio/Technology (1991) 9、280～284〕、本質的に、この方法は2種

の市販試薬、即ち、N-スクシンイミジル-3-[2-ピリジルジチオ]プロピオネート (SpDP; ピアース・ケミカル (Pierce Chem.) 社) と N^6 [6-アミノヘキシル (カルバモイルメチル)- NAD (シグマ・ケミカル社) の反応を含む、生成物をGlcDHcys⁴⁴と反応させて目的の NAD^+ 修飾酵素を作る。このような NAD^+ 標識GlcDHは製造されてきた〔M. パーソン (Persson)、等：Bio/Technology (1991) 9、280～284〕。

第3部： $\text{NAD}^+\text{GlcDHcys}^{44}\text{-Ru(bpy)}_3^{2+}$ の製造

第2部で製造した $\text{NAD}^+\text{-GlcDHcys}^{44}$ 分子と Ru(bpy)_3^{2+} のNHSエステル誘導体 (IGEN社) とを、この試薬と蛋白質との反応が確立された計画 (0.2M NaHCO_3 、pH8.0、室温) (IGEN技術ノート) に基づいて反応させる。 $\text{NAD}^+\text{-GlcDHcys}^{44}$ 表面上の1つ、またはそれ以上のリシン残基は反応の結果 Ru(bpy)_3^{2+} に共有的に結合する。この反応のあとで、遊離未反応の Ru(bpy)_3^{2+} を透析除去して $\text{NAD}^+\text{-GlcDHcys}^{44}\text{-Ru(bpy)}_3^{2+}$ を作る。

実施例4

$\text{NAD}^+ - \text{GlcDHcy s}^{44} - \text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ を用いるグルコースのEC L検知

$\text{NAD}^+ - \text{GlcDHcy s}^{44} - \text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ は平行してグルコースをグルコノラクトンに酸化し、固定化 NAD^+ を NADH に還元する。次いで、EC L計器（IGEN社、メリーランド州ゲイサーバーグ）中で酵素固定化 NADH は効率よく隣接固定化 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ を発光させる。従って、2重修飾酵素はグルコースの存在を発光で知らせる。

試験管中で、酵素（ $\text{NAD}^+ - \text{GlcDHcy s}^{44} - \text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ ）を0.1M リン酸ナトリウム緩衝液（pH7.2）に添加する（ $\leq 1 \mu\text{M}$ ）、この溶液を $25.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$ で平衡化する。グルコース含有溶液を小容積添加する。グルコースが存在しないときは、この酵素複合体は $\text{NAD}^+ - \text{GlcDHcy s}^{44} - \text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ （非電気化学発光性）の形である。グルコースをグルコノラクトンに酵素的変換したあとでは、この酵素複合体は $\text{NADH} - \text{GlcDHcy s}^{44} - \text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ （電気化学発光性）の形である。

更に、EC計器中の酵素複合体に電圧を印加すると、発光し、この複合体は元の形（ $\text{NAD}^+ - \text{GlcDHcy s}^{44} - \text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ ）に戻る。この元の形は次いでグルコースの別の分子の酸化触媒作用をして酵素複合体をもう一度電気化学発光性 NADH 形に転換させる。従って、多数の光子がグリコースの存在下この酵素複合体から発生する。

上記実施例は本発明の各種の改変を示すものであるが、その他の変形も上記の開示から当業者にとってそれ自体容易に考えられるものである。従って、請求項に記載の発明の完全に意図する範囲での変更を上記の特定の実施態様において行うことができる。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US96/09869

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(6) : C12Q 1/32; C12N 9/04; G01N 21/64, 21/76 US CL : 435/26, 190; 422/52, 61, 82.07 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 435/26, 190; 422/52, 61, 82.07 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) APS Search Terms: NAD or NADH, conjugat? or crosslink or linked, dehydrogenase, electrochemilumin?		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 5,310,687 A (BARD et al.) 10 May 1994, see entire document especially column 9, lines 3-60.	1-22
Y	US 5,264,092 A (SKOTHEIM et al.) 23 November 1993, see entire document.	1-22
Y	MÅNSSON et al. Covalent Binding of an NAD Analogue to Liver Alcohol Dehydrogenase Resulting in an Enzyme-Coenzyme Complex not Requiring Exogenous Coenzyme for Activity. Eur. J. Biochem. 1978, Volume 86, pages 455-463, see entire document.	1-22
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document published on or after the international filing date "L" documents which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principles or theory underlying the invention "X" documents of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" documents of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "A" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 25 SEPTEMBER 1996		Date of mailing of the international search report 09 OCT 1996
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 305-3230		Authorized officer JON F. WEBER, Ph.D. Telephone No. (703) 306-0196

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US96/09869

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	PERSSON et al. Continuous Regeneration of NAD(H) Covalently Bound to a Cysteine Genetically Engineered into Glucose Dehydrogenase. Bio/Technology, March 1991, Volume 9, pages 280-284, see entire document, especially page 280 column 1.	1-22
Y	BLACKBURN et al. Electrochemiluminescence Detection for Development of Immunoassays and DNA Probe Assays for Clinical Diagnostics. Clin. Chem. September 1991, Volume 37, Number 9, pages 1534-1539, see entire document.	1-22

フロントページの続き

(81) 指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(KE, LS, MW, SD, SZ, UG), UA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AL, AM, AT, AU, AZ, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, UZ, VN